



Mecanismos de Resistência aos Inibidores do EGFR e do ALK no Cancro do Pulmão

VASCO MANUEL ALMEIDA RODRIGUES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

2016

Índice

1. Introdução.....	4
2. Métodos.....	6
3. Via de Sinalização do EGFR.....	7
3.1. Mecanismos de Resistência aos TKI's do EGFR.....	8
3.1.1. Resistência Intrínseca.....	9
3.1.2. Resistência Adquirida.....	9
3.1.2.1. Mutações Secundárias no EGFR.....	10
3.1.2.2. Ativação por vias de sinalização acessórias (bypass).....	11
3.1.2.3. Transformação Histológica.....	13
3.1.2.4. Outras Alterações Genéticas.....	14
4. Via de Sinalização do ALK.....	15
4.1. Mecanismos de Resistência aos TKI's do ALK.....	16
5. Abordagens Terapêuticas Após Resistências.....	18
5.1. Mutações do EGFR.....	18
5.1.1. Inibidor do EGFR + Quimioterapia vs Quimioterapia.....	18
5.1.2. TKI do EGFR de Segunda Geração.....	20
5.1.2.1. Afatinib.....	20
5.1.2.2. Dacomitinib.....	21
5.1.3. TKI do EGFR de Terceira Geração.....	21
5.1.3.1. Rociletinib.....	22
5.1.3.2. Osimertinib.....	22
5.2. Mutações do ALK.....	23
5.2.1. Inibidores do ALK de Nova Geração.....	24
5.2.1.1. Ceritinib.....	24
5.2.1.2. Alectinib.....	24
5.2.1.3. Brigatinib.....	25
6. Conclusão.....	26

Mecanismos de resistência aos inibidores do EGFR e do ALK no cancro do pulmão

Resumo

Introdução: o cancro do pulmão constitui a principal causa de morte em todo o mundo, sendo responsável por 1,3 milhões de mortes anualmente. O tratamento do cancro do pulmão não pequenas células (CNPC), sobretudo do subtipo adenocarcinoma, melhorou com a descoberta das mutações do *EGFR* e do *ALK*, que proporcionaram a instituição de terapêutica dirigida, como é o caso dos inibidores da tirosina quinase (TKI) do EGFR e do ALK.

O gefitinib, o erlotinib e o afatinib são os agentes anti-EGFR utilizados em primeira linha, enquanto o crizotinib constitui a primeira linha para os doentes com mutação do ALK.

As resistências a estes fármacos surgem no decorrer do primeiro ano de tratamento. Os mecanismos de resistência do EGFR incluem mutações secundárias no local de ligação do EGFR, sendo a principal a mutação T790M, ativação de vias de sinalização acessórias, transformação histológica (transformação para cancro do pulmão de pequenas células e transição epitélio-mesênquima) e outras alterações genéticas que incluem mutações do KRAS, perda do PTEN, mutações do PIK3CA, mutações do BRAF e polimorfismos do BIM. Os mecanismos de resistência do ALK incluem mecanismos ALK-dependentes (mutações pontuais no local de ligação do ALK) e ALK-independentes (ativação de vias de sinalização acessórias).

O tratamento após resistência às terapêuticas anti-EGFR poderá passar pelos inibidores de terceira geração, que têm maior especificidade para a mutação T790M e que incluem o rociletinib e o osimertinib, enquanto as resistências aos inibidores do ALK poderão ser ultrapassadas pelos inibidores de nova geração ceritinib, alectinib e brigatinib.

Objetivo: detalhar quais os principais mecanismos de resistência aos TKI's do EGFR e ALK e rever quais as terapêuticas inovadoras em estudo que podem ultrapassar este problema, oferecendo aos doentes novas oportunidades de tratamento.

Métodos: revisão bibliográfica de artigos publicados entre 01/01/2013-15/02/2016 usando a base de dados PubMed/Medline.

Conclusão: os TKI's têm um grande impacto no prognóstico dos doentes com CNPC estadio IV a curto prazo, mas o problema do desenvolvimento de resistências é transversal a todos os TKI's. O futuro poderá passar pela sua utilização em sequenciação de forma a controlar a doença o maior tempo possível.

Palavras Chave: cancro do pulmão não-pequenas células (CNPC); EGFR; ALK; inibidores da tirosina quinase (TKI's); mecanismos de resistência.

Abstract

Introduction: Lung cancer is a leading cause of cancer-related mortality worldwide, being responsible for 1,3 million deaths annually. Discovery of activating mutations in *EGFR* and *ALK* genes improved non-small cell lung cancer (NSCLC) treatment, particularly adenocarcinoma subtype, by introduction of EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors (TKI). Today, gefitinib, erlotinib and afatinib are the first-line treatment for patients with EGFR-mutated advanced NSCLC, while crizotinib is the first-line treatment for patients with ALK-mutated advanced NSCLC. Unfortunately, patients develop resistance to these agents in the first year of treatment, posing a challenge to oncologists. The resistance mechanisms to EGFR TKI mainly reported are second-site mutations in EGFR, such as T790M mutation, aberrated activation of the bypass pathways, histologic transformation (small cell transformation and epithelial-mesenchymal transition) and another genetic alterations such as KRAS mutation, loss of PTEN, PIK3CA mutations, BRAF mutations and BIM polymorphisms. Resistance mechanisms to ALK TKI include ALK-dependent mechanisms (secondary mutation in the kinase domain of ALK) and ALK-independent mechanisms (activation of alternative pathways).

Third generation EGFR inhibitors were designed to overcome resistance mechanisms and they are particularly potent against T790M mutation. These include rociletinib and osimertinib. Similarly, next generation ALK inhibitors, such

as ceritinib, alectinib and brigatinib had promising results in recent phase I/II studies in overcoming some of ALK resistant mutations.

Objective: in this review of scientific literature are summarized the main resistance mechanisms to EGFR and ALK inhibitors as well as the breakthrough therapies in study that could help oncologists to overcome this emerging problem by offering the best treatment options to patients.

Methods: review of articles published between 01/01/2013-15/02/2016 using electronic database PubMed/Medline.

Conclusion: TKI's improve short-term prognosis in stage IV NSCLC, but resistance development problem is transversal to all. In the future, TKI's may be used one after another to control disease progression as long as possible.

Keywords: non-small cell lung cancer (NSCLC); EGFR; ALK; tyrosine kinase inhibitors (TKI's); resistance mechanisms.

1. Introdução

O cancro do pulmão constitui a principal causa de morte em todo o mundo, sendo responsável por 1,3 milhões de mortes anualmente [Vansteenkiste et al. (2013)]. Dados da ESMO de 2013 revelaram que a taxa de mortalidade na União Europeia diminuiu em 6% nos homens, mas aumentou em 7% nas mulheres, estando estas a atingir o nível de mortalidade dos homens [Reck et al. (2014)]. Em cerca de 70% dos casos a doença é diagnosticada em estadió avançado [Besse et al. (2014)], daí que a sobrevida global seja pobre, com taxas de 41,5% no primeiro ano e de 15% aos cinco anos [Ge et al. (2015)]. O principal fator de risco modificável é o consumo de tabaco, estimando-se que a sua contribuição para o surgimento de cancro atinga os 85-90 % [Ettinger et al. (2015)].

O cancro do pulmão está dividido em dois grandes grupos, tendo como base a classificação histológica: Cancro do Pulmão de Pequenas Células (CPC) e Cancro do Pulmão Não-Pequenas Células (CNPC), este último contribuindo com 85-90% dos casos [Ettinger et al. (2015)]. Esta divisão é útil sobretudo em termos de tratamento, uma vez que o CNPC possui uma vasta gama de alternativas terapêuticas comparativamente ao CPC, mas também em relação ao prognóstico, tendo o CPC um prognóstico mais reservado.

O CNPC engloba o adenocarcinoma (50%) [Boolell et al. (2015)], o carcinoma espinocelular (30%) [Boolell et al. (2015)], o cancro do pulmão de grandes células e os tipos mistos, sendo que o tratamento varia não só com a histologia e o estadio, mas também com as alterações moleculares e genéticas, a idade, o perfil funcional (ECOG), as comorbilidades e as preferências do doente [Reck et al. (2014)]. Além disso, o esquema terapêutico a implementar passa sempre por uma abordagem multidisciplinar em que o doente costuma ter participação ativa através das consultas de grupo.

O tratamento do CNPC inclui a cirurgia (estádios I e II), que pode ser complementada com quimioterapia adjuvante (estádios II e III), sendo o protocolo mais utilizado a cisplatina combinada com vinorelbina. A radioterapia primária pode ser realizada em doentes em que a cirurgia esteja contraindicada, e nos tumores de localização periférica no estadio I. A quimioterapia é sempre parte integral do tratamento do estadio III, independentemente de terem sido submetidos a cirurgia e/ou radioterapia prévias, tendo por base a cisplatina combinada com etoposido ou vinorelbina [Vansteenkiste et al. (2013)].

A quimioterapia deve ser considerada para os doentes em estadio IV com score funcional ECOG Performance Status (OS) 0-2, optando pela combinação de fármacos com menor perfil de efeitos adversos, mas que inclui normalmente compostos derivados da platina (cisplatina e carboplatina) em combinação com outro agente (paclitaxel, docetaxel, pemetrexedo, vinorelbina, gemcitabina, etoposido) [Reck et al. (2014); Ettinger et al. (2015)]. Na primeira linha de tratamento são realizados 4 ciclos de quimioterapia, podendo ir até 6 [Reck et al. (2014); Ettinger et al. (2015)].

O tratamento do cancro do pulmão em estadio IV sofreu uma evolução na última década com a descoberta de mutações suscetíveis a terapêuticas dirigidas. Dois exemplos incluem a descoberta de mutações no domínio tirosina quinase no EGFR e no gene de fusão *ALK-*EML4** que são alvos para a terapêutica dirigida com inibidores da tirosina quinase (TKI's). Estas mutações alteram vias de sinalização intracelulares que controlam a apoptose e a proliferação celular [Shea et al. (2015)].

As mutações do EGFR foram identificadas pela primeira vez no cancro do pulmão em 2004, com uma prevalência estimada global que pode chegar aos 20% no adenocarcinoma [Shea et al. (2015)]. As deleções no exão 19 e a

substituição L858R no exão 21 constituem 85-90% dos tumores com mutação no EGFR [Shea et al. (2015); Tan et al. (2015)] e estão frequentemente associadas a um perfil clínico específico, que inclui mulheres, não-fumadores, asiáticos e histologia de adenocarcinoma [Boolell et al. (2015)]. Atualmente existem 3 fármacos aprovados pelo INFARMED para utilização neste grupo de doentes e que incluem o erlotinib (Tarceva ®), o gefitinib (Iressa ®) e o afatinib (Giotrif ®), que vieram substituir a quimioterapia como primeira linha de tratamento em doentes mutados. No entanto, estes doentes sofrem progressão da doença após um período de 10-13 meses [Tan et al. (2015)] como consequência da aquisição de resistências ao tratamento, em que o mecanismo mais frequente (50-60%) é a substituição de uma metionina por uma treonina na posição 790 no exão 20 (T790M), que diminui a afinidade dos TKI's para o seu recetor [Tan et al. (2015)].

Os rearranjos no gene do *ALK* ocorrem em 3-5% dos doentes com CNPC e tipicamente afetam pessoas jovens, não fumadores ou fumadores leves, com histologia de adenocarcinoma, mas sem predisposição por género ou etnia [Cameron et al. (2015)]. O crizotinib (Xalkori ®) foi o primeiro fármaco aprovado pelo INFARMED (2012) para o tratamento destes doentes, sendo que as resistências adquiridas surgem após um período de 7-11 meses de tratamento [Cameron et al. (2015)]. Mais recentemente (2015), o ceritinib (Zykadia ®) foi aprovado para o tratamento dos doentes que progridem após terapia com crizotinib. O alectinib (Alecensa ®) foi aprovado no Japão (2014) com a mesma indicação [Cameron et al. (2015)]. Os mecanismos de resistência são classificados como ALK-dependentes ou ALK-independentes, sendo bastante mais heterogêneos do que os mecanismos de resistência associados ao EGFR.

O objetivo desta revisão da literatura passa pela identificação e caracterização dos mecanismos conhecidos de resistência aos inibidores da tirosina quinase usados nos doentes com mutações do EGFR e ALK, bem como das possíveis abordagens terapêuticas nos doentes com essas resistências.

2. Métodos

A pesquisa de artigos foi realizada utilizando a base de dados eletrónica PubMed/Medline, restrita ao período entre 01/01/2013 e 15/02/2016, incluindo

apenas artigos com base em estudos em humanos. As palavras chave utilizadas foram “*ALK inhibitors lung cancer*”, “*EGFR inhibitors lung cancer*” e “*resistance EGFR TKIs*”, tendo a busca inicial resultando em 459, 1515 e 317 artigos, respetivamente, completando um total de 2291 artigos.

A pesquisa foi filtrada para incluir apenas artigos completos (“*full text*”) de revisões sistemáticas, meta-análises, ensaios clínicos, revisões da literatura, estudos observacionais e *case report* resultando num total de 973 artigos. Após a leitura do *abstract* foram selecionados 56 artigos, que correspondem a 24 revisões da literatura, 15 ensaios clínicos, 14 estudos observacionais e 3 *case report*, sendo que os critérios de inclusão foram os seguintes: restrição da abordagem ao cancro do pulmão; citação dos principais mecanismos de resistência; menção aos principais fármacos TKI's e seu modo de ação e estudos comparativos entre os diversos TKI's de nova geração.

3. Via de Sinalização do EGFR

O EGFR, também conhecido como ERBB1 ou HER1, é um recetor de tirosina quinase transmembranar (TKR) [Huang et al. (2015)]. É um membro da família de recetores HER e um componente essencial nas vias de sinalização intracelulares [Huang et al. (2015)]. A interação com os seus ligandos (EGF e TGF- α) leva a alterações conformacionais no EGFR com autofosforilação do domínio citoplasmático, que ativa vias de sinalização a jusante [Huang et al. (2015)]. As três vias principais a jusante que sofrem ativação mediada pelo EGFR são as vias de sinalização RAS/RAF/MAPK, PI3K/AKT e JAK/STAT, que estimulam a mitose, levando à proliferação celular e inibição da apoptose [Huang et al. (2015)]. Estas vias de sinalização intracelulares são cruciais no normal crescimento e desenvolvimento celulares [Huang et al. (2015)].

O EGFR também serve de estímulo para a proliferação de células cancerígenas, uma vez que mutações no gene *EGFR* e consequente expressão de proteínas anómalas, levam à ativação perpetuada das vias de sinalização a jusante, especialmente no que diz respeito ao cancro do pulmão [Huang et al. (2015)]. O gene *EGFR* está localizado no cromossoma 7 e consiste em 28 exões [Huang et al. (2015)]. A função de tirosina quinase é codificada pelos exões 18-24, com mais de 90% das mutações conhecidas a ocorrerem nos exões 19-21

[Huang et al. (2015)]. Até à data quatro mutações foram identificadas nos exões do *EGFR* e todas elas envolvem o domínio de quinase citoplasmático: mutação G719 no exão 18, deleção dos aminoácidos 747-750 no exão 19, inserções *in-frame* no exão 20 e as mutações L858 e L861 no exão 21 [Roviello (2015)]. As mutações mais frequentes incluem as deleções no exão 19 (40-50%) e as mutações no exão 21 (30-40%), sendo preditores de resposta favorável aos TKI's [Roviello (2015); Costa et al. (2015)].

Os TKI's são uma opção terapêutica em doentes com mutações do *EGFR*, pois inibem o domínio de tirosina quinase citoplasmático competindo com o ATP, impedindo que este se ligue ao recetor. Além disso, também induzem apoptose mediada pelo BCL2-like 11 (BIM) [Huang et al. (2015)].

No entanto, o tratamento com TKI's não tem benefício permanente, uma vez que resistências costumam surgir em menos de 1 ano.

3.1. Mecanismos de Resistência aos TKI's do EGFR

A resistência associada à terapêutica dirigida com TKI é classicamente dividida em dois grupos: resistência intrínseca e resistência adquirida [Maione et al. (2015); Tan et al. (2015)].

A resistência intrínseca denota ausência de resposta *de novo* ao tratamento, enquanto que a resistência adquirida corresponde à progressão da doença após um período de resposta inicial ao tratamento [Maione et al. (2015); Tan et al. (2015)].

Os critérios de resistência adquirida incluem: tratamento prévio com um TKI; presença documentada de mutação do *EGFR* sensível aos TKI's no início do tratamento ou benefício clínico inicial com o tratamento com um TKI, definido como resposta parcial ou completa pelos critérios RECIST ou da WHO ou benefício clínico significativo e sustentável (≥ 6 meses) após iniciar TKI; progressão sistémica da doença (RECIST ou WHO) aquando do tratamento contínuo com TKI ou tratamento pelo menos nos últimos 30 dias; ausência de terapêutica sistémica adicional entre a cessação dos TKI's e a nova terapêutica [Maione et al. (2015); Tan et al. (2015)].

3.1.1. Resistência Intrínseca

As taxas de resposta global (TRG) aos TKI's do EGFR são altas entre os doentes mutados, no entanto alguns não respondem a estes fármacos desde o início do tratamento. Os mecanismos de resistência intrínseca são alvo de discussão, mas pensa-se que em parte resultarão de sensibilidades diferentes aos TKI's entre as várias mutações do EGFR [Costa et al. (2015)]. As mutações “clássicas” (deleções do exão 19 e mutação L858R no exão 21) conferem grande sensibilidade aos TKI's. Por outro lado, inserções ou duplicações no exão 20, que são encontradas em 4-10% dos doentes com mutações EGFR, a mutação pontual S768I (exão 20) e mutações pontuais no exão 18 (G719A, G719S e G719C) têm sido descritas como resistentes aos TKI's [Siegelin et al. (2014); Tan et al. (2015)].

A resistência intrínseca também pode ser conferida por alterações genéticas que ocorrem concomitantemente com mutações do EGFR sensíveis. A amplificação do *MET* e a mutação T790M são mecanismos de resistência adquirida bem conhecidos. No entanto, tem sido sugerido que estas alterações podem conferir resistência intrínseca quando presentes em frequências alélicas elevadas no início do tratamento [Maione et al. (2015)].

3.1.2. Resistência Adquirida

As vias de sinalização intracelulares responsáveis pelo crescimento e sobrevivência celulares estão muito dependentes da ativação do EGFR, logo, as células tumorais que têm uma capacidade de adaptação ao meio ambiente, desenvolvem mecanismos de resistência que permitem ativar o EGFR embora este seja inibido pelos TKI's, uma vez que isso irá ditar a sua capacidade de sobrevivência [Remon et al. (2014)].

Vários grupos de investigadores analisaram os mecanismos de resistência em doentes após progressão aos TKI's tendo por base biópsias tumorais repetidas na altura da progressão da doença, tendo sido concluído que existem pelo menos quatro grupos principais de mecanismos de resistência adquirida: presença de mutações secundárias no EGFR; presença de ativação paralela das vias de sinalização a jusante do EGFR (ativação por *bypass*);

fenómenos de transformação fenotípica e ocorrência de alterações genéticas adicionais. No entanto, em aproximadamente 30% dos casos os mecanismos de resistência não são identificados [Remon et al. (2014)].

3.1.2.1. Mutações Secundárias no EGFR

A mutação com substituição de uma metionina por uma treonina no codão 790 do exão 20 (T790M) do gene *EGFR* é o tipo mais comum de mutação que confere resistência adquirida aos TKI's, estando presente em 50-60% dos casos [Kuipera et al. (2014); Remon et al. (2014); Tan et al. (2015)].

A T790M tem sido designada como um resíduo “*gatekeeper*”, importante para regular a especificidade inibitória no local de ligação do ATP, ou seja, a mutação T790M aumenta a afinidade do local de ligação do ATP para o ATP, competindo desta forma com os TKI's e conferindo resistência [Huang et al. (2015)].

Atualmente existem duas teorias que explicam a presença de mutações secundárias: subclonização e mutação induzida [Huang et al. (2015)]. A subclonização defende que no início do tratamento com TKI, o tumor já expressa alguns clones mutados, mas como estão em quantidades diminutas não se conseguem identificar pelos métodos de genética molecular atuais e não conferem resistência imediata. O contato com os TKI's induz pressão seletiva que altera a composição tumoral, levando ao aumento do número destes clones até que eventualmente causem resistência. A segunda teoria defende que estes clones são produzidos *de novo* apenas após o contacto com os TKI's.

A mutação T790M também pode ser detetada como mecanismo primário de resistência em biópsias tumorais de doentes sem exposição prévia aos TKI's e neste caso a sua presença confere pior prognóstico ao tratamento com TKI [Remon et al. (2014)]. No entanto, ao contrário do que acontece com a mutação primária T790M, a resistência adquirida pela mutação T790M identifica um subgrupo de cancro do pulmão EGFR-mutado com crescimento muito mais indolente em modelos pré-clínicos. Além disso, dados de doentes com mutação T790M adquirida demonstram sobrevivência após progressão mais longa quando comparados com os doentes T790M-negativos, bem como maior probabilidade de a progressão ocorrer em locais já com doença estabelecida

anteriormente e, por isso, terem melhor capacidade funcional do que os doentes T790M-negativos [Remon et al. (2014)].

Outras mutações secundárias do EGFR associadas com a resistência adquirida incluem: T854A no exão 21; L747S e D761Y, ambas no exão 19. Contudo a frequência destas mutações é muito baixa quando comparada com a da T790M [Remon et al. (2014); Tan et al. (2015)].

Uma vez que a sinalização celular fica dependente do EGFR mesmo após a aquisição destas mutações adquiridas, vários ensaios clínicos estudaram o impacto da intensificação da inibição do EGFR através do uso de inibidores do EGFR de 2ª e de 3ª gerações. Estas terapias serão abordadas mais à frente nesta revisão.

3.1.2.2. Ativação por vias de sinalização acessórias (*bypass*)

A ativação síncrona de quinases redundantes produz resistência adquirida através da ativação de vias de sinalização acessórias. As várias alterações associadas a este mecanismo incluem: expressão aumentada de HER2, amplificação do *c-MET*, expressão aumentada de HGF, anormalidades do IGFR, expressão aumentada de AXL e anormalidades em moléculas de múltiplas vias da angiogénese [Huang et al. (2015)].

A família de recetores HER é constituída pelo EGFR (HER1), HER2, HER3 e HER4. Estes recetores têm um domínio de tirosina quinase citoplasmático que pode ser ativado através do ligando específico, a que se segue dimerização do recetor. Embora o HER2 aparente não ter nenhum ligando específico, parece interagir de forma reversível com o EGFR e o HER3 para formar heterodímeros ativos que ativam vias de sinalização acessórias que governam a proliferação e migração celulares. Desta forma, mutações ou expressão aumentada de HER2 estão envolvidas na resistência aos TKI's em cerca de 12% dos casos e podem ser um bom alvo de tratamento [Huang et al. (2015); Tan et al. (2015)]. Comparativamente com outras proteínas HER, não existem atualmente mutações conhecidas que confirmem propriedades oncogénicas ao HER3, mas esta proteína também participa indiretamente na resistência aos TKI's. A fosforilação do HER3 é guiada pelo HER1, HER2 ou amplificação do proto-oncogene *c-Met*. O HER3 serve como principal ativador

das vias de sinalização PI3K/AKT e MEK/MAPK, contribuindo para a sobrevivência da maior parte das células tumorais. O uso de anticorpos monoclonais contra o recetor do HER3, como o MM-121 e MM-111 é uma estratégia que está atualmente em estudo [Huang et al. (2015)].

O proto-oncogene *MET* codifica um recetor transmembranar de tirosina quinase que está envolvido na motilidade das células epiteliais, crescimento e angiogénese dos tumores [Remon et al. (2014)]. Tem como ligando o Fator de Crescimento derivado do Hepatócito (HGF). A amplificação do *MET* é reportada em 5-10% dos doentes com resistência adquirida aos TKI's [Tan et al. (2015)], causando resistência através da fosforilação do HER3 independente do EGFR, levando à ativação da via de sinalização do PI3K/AKT mesmo na presença de um TKI [Remon et al. (2014)]. Embora a amplificação do *MET* possa ocorrer com a mutação T790M, cerca de 60% dos doentes com amplificação do *MET* não têm mutação T790M [Remon et al. (2014)]. Em modelos pré-clínicos, os inibidores do MET conseguem tratar este tipo de resistência, mesmo em células com a mutação T790M [Remon et al. (2014)]. Existe uma correlação inversa entre a presença da mutação T790M e o número de cópias do gene *MET*, sugerindo um papel complementar dos dois mecanismos na aquisição de resistências [Remon et al. (2014)].

O HGF é o ligando do MET e atua como fator pleiotrópico e citocina, promovendo a proliferação, sobrevivência, motilidade, diferenciação e morfogénese celulares [Huang et al. (2015)]. A expressão elevada do HGF é outro dos mecanismos de resistência aos TKI's, que induz resistência através da ativação do MET, que restaura a fosforilação dos mediadores que ativam as vias de sinalização MAPK/ERK1/2 e PI3K/AKT [Huang et al. (2015)]. Esta ativação é independente do EGFR e HER3 [Remon et al. (2014); Huang et al. (2015)].

Anormalidades no recetor do fator de crescimento derivado da insulina (IGFR) também contribuem para a resistência aos TKI's. O IGF-1R participa na via de sinalização do PI3K. A perda de expressão de proteínas ligantes do IGF-1R nas células tumorais tratadas com TKI aumentam a atividade da sinalização através do IGF-1R, levando à resistência [Huang et al. (2015)].

O AXL pertence à família TAM de recetores da tirosina quinase e tem como ligando a proteína GAS6 [Huang et al. (2015)]. A ativação do AXL aumenta a migração, proliferação e agregação celulares através de várias vias de

sinalização. Os investigadores sugerem que a ativação exagerada do AXL promova a ativação do AKT, MAPK e NF-kB, talvez em associação com a transição epitélio-mesênquima, levando à resistência aos TKI's [Huang et al. (2015)].

A angiogénese é um passo fundamental no crescimento tumoral e metastização. Por isso, a inibição de múltiplas vias de sinalização da angiogénese pode não só melhorar a atividade antitumoral dos TKI's, como prevenir as resistências. Possíveis alvos para esses tratamentos incluem os fatores de crescimento vascular endotelial (VEGF's), os fatores de crescimento fibroblástico (FGF's), os fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF's) e seus respetivos recetores [Huang et al. (2015)].

3.1.2.3. Transformação Histológica

Até ao momento pouco se sabe acerca deste mecanismo de resistência adquirida, que inclui a transformação para cancro do pulmão de pequenas células (CPC) [Kim et al. (2015)] e a transição epitélio-mesênquima.

A transformação para CPC ocorre em 3-5% dos casos de resistência adquirida [Remon et al. (2014)]. Embora o mecanismo exato ainda não esteja esclarecido, pensa-se que as vias do p53 e do RB possam ter um papel importante [Remon et al. (2014)]. Estes tumores passam a expressar marcadores neuroendócrinos, mantêm a mutação EGFR original e respondem à quimioterapia padrão do CPC, mas até ao momento nenhum demonstrou a presença da mutação T790M ou amplificação do *MET* [Remon et al. (2014)].

A transição epitélio-mesênquima (TEM) é um processo fisiológico durante o desenvolvimento embrionário que parece ser restaurado nos tecidos aquando do processo de regeneração e cicatrização ou em certas condições patológicas como a fibrose e o cancro [Huang et al. (2015)]. A TEM é um fenómeno em que as células tumorais perdem o seu fenótipo epitelial, nomeadamente através da perda da proteína de adesão celular E-caderina, e desenvolvem uma morfologia mais fusiforme, característica das células mesenquimatosas, com aquisição de marcadores mesenquimatosos, como a vimentina, fibronectina e N-caderina [Remon et al. (2014); Huang et al. (2015)]. O mecanismo exato da aquisição da TEM permanece incerto, mas pensa-se que vários mediadores possam estar

implicados, entre os quais as vias de sinalização do AXL, TGF- β , FGF, EGF, HGF, IL-8, IL-6, Notch-1, SOX9, FoxO4, SRC e CRIPTO-1 [Huang et al. (2015)].

3.1.2.4. Outras Alterações Genéticas

Alterações em vias de sinalização paralelas ou secundárias ao EGFR nos doentes EGFR não mutados (*wild-type*) também conferem resistência aos TKI's. Estas alterações podem estar presentes desde o início ou fazerem parte de um mecanismo de resistência adquirida e incluem mutações do *KRAS*, perda do *PTEN*, mutações do *PIK3CA*, mutações do *BRAF* e polimorfismos do *BIM*.

As proteínas RAS incluem o K-RAS, N-RAS e H-RAS, que são GTPases que participam em várias funções críticas ao normal funcionamento celular. Mutações oncogénicas dos genes *RAS*, que produzem proteínas RAS constitutivamente ativas resultam em proliferação descontrolada e sobrevivência das células tumorais. No total, 25-30% dos adenocarcinomas apresentam mutação do *KRAS* [Boolell et al. (2015); Shea et al. (2015)] e 80% das mutações *KRAS* ocorrem no códon 12, sendo que as outras mutações estão localizadas principalmente no códon 13 e 61. A alteração genética do RAS constitui um fator de mau prognóstico para a sobrevivência dos doentes com CNPC e estas mutações conferem resistência intrínseca aos TKI's, uma vez que mutações do *KRAS* são mutuamente exclusivas com mutações *EGFR* e *ALK* [Boolell et al. (2015); Huang et al. (2015)].

O *PTEN* medeia a ativação do AKT, regulando negativamente a via de sinalização PI3K/AKT/mTOR, o que resulta em paragem do ciclo celular em G1 e apoptose. A deleção do gene supressor tumoral *PTEN* no cromossoma 10 contribui para a resistência adquirida aos TKI's através da ativação do AKT e consequentemente do EGFR [Huang et al. (2015)].

O gene *PIK3CA* codifica a subunidade catalítica PI3K [Huang et al. (2015)]. As mutações do *PIK3CA* são identificadas em cerca de 5% dos doentes com mutação *EGFR* que desenvolveram resistência adquirida aos TKI's e pensa-se que esteja presente em 2% de todos os adenocarcinomas em conjunto com outras mutações [Remon et al. (2014)]. Estudos recentes demonstraram que estas mutações coexistem frequentemente com mutações *EGFR* e *KRAS*

[Huang et al. (2015)]. Doentes com mutação apenas no *PIK3CA* com CNPC têm pior prognóstico [Huang et al. (2015)].

O BRAF é um componente da via de sinalização EGFR/RAS/RAF, que codifica uma quinase RAS responsável pelo crescimento celular, diferenciação, apoptose e transformação maligna. Mutações do *BRAF* (G469A, V600E e V599E) induzem resistência aos TKI's [Huang et al. (2015)]. Estas mutações são identificadas em cerca de 2% dos adenocarcinomas, com a V600E identificada em 1% deles [Boolell et al. (2015)].

O BIM é um membro da família BCL-2 com função pró-apoptótica, que desempenha um papel importante na indução da apoptose celular e metastização tumoral. A sua regulação aumentada é necessária para induzir apoptose através do EGFR, mediada pelos TKI's do EGFR. O polimorfismo do *BIM* que altera o *splicing* do exão 4 para o 3 resulta na expressão de isoformas de BIM sem o domínio pró-apoptótico BCL2-BH3, o que confere resistência intrínseca aos TKI's [Huang et al. (2015)].

Recentemente, *Liang et al* (2016) reportaram uma caso de uma doente de 46 anos com adenocarcinoma do pulmão estadio IVb que apresentava mutação do *EGFR* devido a deleção no exão 19, que inicialmente respondeu ao erlotinib, mas que aos 8 meses de tratamento sofreu progressão da doença, sobretudo de metástases hepáticas. A análise do DNA livre plasmático (ctDNA) demonstrou a presença da translocação *EML4-ALK*. Este caso vem demonstrar que talvez as mutações do *EGFR* e *ALK* não sejam totalmente exclusivas, com a mutação do *ALK* a poder funcionar como possível mecanismo de resistência.

4. Via de Sinalização do ALK

O ALK (*anaplastic lymphoma kinase*) é um recetor de tirosina quinase transmembranar que é um membro da superfamília dos recetores da insulina, um largo grupo de recetores que também inclui outras tirosinas quinases de relevância oncológica, como MET e RON [Bayliss et al. (2015); Sullivan et al. (2016)]. O ALK é expressado normalmente apenas no sistema nervoso central, onde se pensa que poderá ter um papel no desenvolvimento e diferenciação neurais [Bayliss et al. (2015); Farina et al. (2016)]. A sinalização através do ALK nas células cancerígenas ocorre através de três mecanismos principais: fusão

de genes (*NPM-ALK*, *EML4-ALK*), amplificação do gene do *ALK* e mutações pontuais ativadoras (F1174L no neuroblastoma) [Bayliss et al. (2015)].

O *ALK* foi identificado pela primeira vez em 1994 como parte da proteína oncogénica de fusão *NPML-ALK* associada ao linfoma anaplásico de grandes células [Sullivan et al. (2016)]. Em 2007 verificou-se a descoberta da proteína de fusão *EML4-ALK* num doente com adenocarcinoma do pulmão, a primeira proteína de fusão oncogénica descoberta no cancro do pulmão [Bayliss et al. (2015); Sullivan et al. (2016)].

As proteínas *EML* (*echinoderm microtubule-associated protein-like*) interagem com os microtúbulos e a tubulina solúvel, tendo sido demonstrada uma associação funcional entre o fuso mitótico e estas proteínas [Bayliss et al. (2015)]. São expressadas em vários tecidos, incluindo o pulmão e pensa-se que terão um papel crucial na formação e manutenção dos microtúbulos [Bayliss et al. (2015)]. O gene *EML4* e *ALK* situam-se ambos no cromossoma 2 e a fusão ocorre através de uma inversão paracêntrica [Bayliss et al. (2015)]. Embora os mecanismos de sinalização intracelulares não estejam totalmente clarificados, acredita-se que a proteína de fusão *EML4-ALK* ative a sinalização através das vias Akt, ERK e STAT3 [Bayliss et al. (2015)].

Os rearranjos do *ALK* estão presentes em 3-7% dos doentes com CNPC [Bayliss et al. (2015); Sullivan et al. (2016)] e são mais comuns em doentes não fumadores/ fumadores leves, histologia de adenocarcinoma, idades mais jovens, mulheres e tumores *wild-type* para EGFR e KRAS [Sullivan et al. (2016)].

4.1. Mecanismos de Resistência aos TKI's do ALK

À semelhança do que acontece com o tratamento com TKI do EGFR, os TKI's do *ALK* levam a respostas excelentes em termos de remissão da doença no início do tratamento, mas a resistência acaba por ocorrer num período que varia entre os 7-11 meses [Cameron et al. (2015); Sullivan et al. (2016)].

As resistências são divididas em dois tipos clássicos: mecanismos *ALK*-dependentes e mecanismos *ALK*-independentes [Cameron et al. (2015); Sullivan et al. (2016)].

Os mecanismos *ALK*-dependentes incluem mutações pontuais no domínio de tirosina quinase do *ALK*, amplificações do gene *ALK* ou ambas,

enquanto os mecanismos ALK-independentes dizem respeito à ativação de outras vias de sinalização [Cameron et al. (2015)].

As mutações pontuais correspondem a quase um terço dos mecanismos de resistência, e incluem a mutação L1196M, que é a mutação análoga à T790M do *EGFR*, sendo a que mais comumente é identificada. Outras mutações identificadas incluem: 1151Tins, L1152R, C1156Y, I1171T, F1174L, V1180L, G1202R, D1203N, S1206Y e G1269A [Cameron et al. (2015)]. Estas mutações aumentam a afinidade do recetor de tirosina quinase para o ATP, diminuindo, portanto, a afinidade da ligação dos TKI's.

A amplificação do gene *ALK*, definida como o aumento do número de cópias do rearranjo *EML4-ALK* após tratamento com TKI, ocorre em cerca de 18% dos casos, sendo também um mecanismo de resistência importante [Roviello (2015)].

Uma vez que as mutações pontuais e a amplificação do *ALK* ainda ficam dependentes da sinalização através do ALK, os inibidores de 2ª geração que são mais potentes a inibir a quinase do ALK e que são ativos contra algumas das mutações descritas, podem desempenhar um papel fulcral no tratamento futuro destes doentes.

Os mecanismos ALK-independentes ocorrem tipicamente através do recrutamento de vias de sinalização oncogénicas alternativas que formam um *bypass* à ativação através do ALK, correspondendo a 20% dos casos [Maione et al. (2015)]. Estas incluem a sinalização através do EGFR, amplificação do KIT, mutações do KRAS e ativação do IGF1 [Cameron et al. (2015)]. Como estes mecanismos de resistência já foram abordados anteriormente para o EGFR, não irão ser alvo de discussão aqui.

No entanto, em cerca de 30% dos casos os mecanismos de resistência permanecem desconhecidos, sendo necessários mais estudos que possam clarificar quais as vias envolvidas e quais serão as possíveis abordagens terapêuticas.

5. Abordagens Terapêuticas Após Resistências

5.1. Mutações do EGFR

As recomendações atuais dizendo respeito ao CNPC em estadio IV afirmam que todas as lesões devem ser biopsadas antes de se iniciar o tratamento, não só para identificar o tipo histológico, mas também para a possível identificação de mutações sensíveis a terapia dirigida. No caso de identificação de mutação do *EGFR* (deleções exão 19 ou L858R), três inibidores de tirosina quinase estão disponíveis atualmente como tratamento de primeira linha: gefitinib e erlotinib (inibidores de 1ª geração) e o afatinib (inibidor de 2ª geração). A sua eficácia foi comprovada por vários estudos clínicos randomizados de fase três que demonstraram melhores taxas de sobrevivência livre de progressão (SLP), melhores taxas de resposta ao tratamento e melhor qualidade de vida, comparativamente com o esquema de quimioterapia padrão.

No entanto, não existe consenso sobre qual será a melhor abordagem após o surgimento de resistências. A NCCN propõe a continuação do TKI após progressão assintomática, após progressão sintomática com lesão isolada (sistêmica e/ou cerebral) e terapia local, ou passar para o esquema de quimioterapia padrão com progressão e múltiplas lesões sistêmicas.

Vários esquemas de tratamento de 2ª linha estão em estudo com o objetivo de se tentar ultrapassar ou atenuar o problema das resistências, entre os quais: continuação do TKI mais quimioterapia/ quimioterapia isolada, inibidores do EGFR 2ª geração e inibidores EGFR 3ª geração.

5.1.1. Inibidor do EGFR + Quimioterapia vs Quimioterapia

A escolha de continuar com os TKI's do EGFR após progressão da doença pode é baseada nos relatos de *flares* da doença (rápida deterioração clínica) após a descontinuação abrupta destes fármacos. A heterogeneidade clonal nas lesões que progridem é proposta como sendo a responsável pelo rápido crescimento dos clones sensíveis aos TKI's do EGFR comparativamente com os clones resistentes após a descontinuação da terapêutica [Tan et al. (2015)].

Dois estudos retrospectivos analisaram o tratamento subsequente de doentes que progrediram inicialmente aos TKI's do EGFR.

Qiao et al (2015) estudaram 240 doentes que progrediram após tratamento inicial com TKI do EGFR e que foram incluídos em três grupos subsequentes de tratamento: grupo que manteve o TKI (21), grupo que manteve TKI mais quimioterapia (23) e grupo que fez quimioterapia apenas (143). Os restantes (53) fizeram apenas tratamento de suporte. As taxas de controlo da doença (TCD) dos 187 doentes que continuaram com o TKI, fizeram TKI mais quimioterapia e fizeram apenas quimioterapia foram de 66,7%, 73,9% e 44,8%, respetivamente. O período de sobrevivência livre de progressão (SLP) foi de 3, 3.3 e 2 meses, respetivamente. A TCD e a SLP para o grupo que fez TKI mais quimioterapia vs apenas quimioterapia foram significativamente superiores ($p=0,006$ e $p=0,037$, respetivamente). A sobrevivência global média (SGB) para os grupos TKI, TKI mais quimioterapia e quimioterapia apenas foi de 6,9, 11,6 e 8,8 meses, respetivamente.

Este estudo vem sugerir que a continuação do TKI do EGFR em combinação com a quimioterapia pode trazer benefícios nos doentes com resistência adquirida aos TKI's.

Goldberg et al (2013) analisaram retrospectivamente doentes com resistência adquirida que receberam quimioterapia subsequentemente. Os doentes foram classificados como recebendo quimioterapia mais erlotinib e quimioterapia apenas. Foram incluídos 78 doentes, 34 tratados com erlotinib mais quimioterapia e 44 apenas com quimioterapia. As taxas de resposta objetiva (TRO) para os grupos erlotinib mais quimioterapia e apenas quimioterapia foram de 41% e 18%, respetivamente, mas não houve alteração significativa a nível de SLP, nem de sobrevivência global (SG).

Na tentativa de se esclarecer qual o papel da continuação do TKI do EGFR após progressão da doença, comparativamente com a instituição de quimioterapia, foi feito o ensaio clínico randomizado controlado por placebo de fase III IMPRESS [Soria et al. (2015)]. Neste ensaio clínico foram comparados dois grupos: gefitinib mais pemetrexedo e cisplatina vs placebo mais pemetrexedo e cisplatina. Os 265 doentes incluídos foram distribuídos aleatoriamente pelos dois grupos. Não se verificou significância estatística nas taxas de resposta objetiva entre os dois grupos (31% vs 34%, respetivamente) e

a SLP foi de 5,4 meses em ambos os grupos. A sobrevivência global foi superior no grupo placebo (17,2 meses vs 14,8 meses). O ensaio clínico IMPRESS é o único ensaio clínico de fase III que até agora abordou a questão de continuar o TKI do EGFR após a progressão da doença juntamente com a quimioterapia. A continuação do gefitinib parece não ter benefício pelo que a continuação dos TKI's além da progressão da doença não faz parte da prática clínica.

5.1.2. TKI do EGFR de Segunda Geração

As resistências adquiridas após o tratamento com os inibidores de 1ª geração levou a que vários grupos desenvolvessem inibidores de 2ª geração, que são inibidores irreversíveis do EGFR e que teriam maiores vantagens, tais como: maior afinidade para o domínio EGFR; inibição pan-HER e atividade *in-vitro* contra a mutação adquirida T790M [Tan et al. (2015)].

Apesar dessas vantagens, os estudos revelaram um grande perfil de efeitos adversos, com uma janela terapêutica muito estreita, possivelmente devido à inibição do EGFR-*wild type*. Dos inibidores do EGFR de 2ª geração, o afatinib e o dacomitinib foram os que progrediram mais nos estudos [Tan et al. (2015)].

5.1.2.1. Afatinib

O primeiro grande estudo que teve como objetivo analisar a eficácia do afatinib em doentes com adenocarcinoma do pulmão com falência prévia à terapêutica com TKI do EGFR foi o ensaio clínico de fase 2b/3 LUX-Lung 1 [Miller et al. (2012)]. Este ensaio clínico comparou afatinib mais terapêutica de suporte vs placebo mais terapêutica de suporte em doentes com CNPC que tinham progredido após uma ou duas linhas de quimioterapia e/ou gefitinib ou erlotinib. A sobrevivência global média foi de 10,8 meses no grupo do afatinib e 12 meses no grupo placebo. A SLP foi superior no grupo do afatinib (3,3 meses vs 1,1 meses). Não se verificaram respostas completas ao tratamento, no entanto 7% tiveram respostas parciais no grupo do afatinib contra <1% no grupo placebo. Os efeitos adversos mais frequentes no grupo do afatinib foram diarreia (87%) e *rash* (78%). Embora não se tivesse verificado benefício em termos de

sobrevivência global (possivelmente devido aos tratamentos anti-tumorais após a progressão nos dois grupos), a SLP e as taxas de resposta parcial obtidas levam a crer que o afatinib poderá ter algum benefício nesta população de doentes.

Após este estudo, o tratamento com afatinib foi comparado com a quimioterapia em doentes com mutações do *EGFR* e sem tratamento prévio com TKI no ensaio clínico de fase III LUX-Lung 3. Comparados com os do grupo da quimioterapia, aqueles que receberam tratamento com afatinib tiveram SLP de 11,1 meses vs 6,9 meses ($p < 0,001$), com os efeitos adversos a serem de baixo grau. Estes resultados levaram à aprovação do afatinib como tratamento de 1ª linha pela FDA e pela EMA nos doentes com mutação do *EGFR* em 2013.

5.1.2.2. Dacomitinib

O dacomitinib é um inibidor irreversível da família das tirosinas quinases HER, que inibe seletivamente o EGFR. Estudos em modelos animais revelaram regressão tumoral com o dacomitinib em linhas celulares de CNPC, incluindo aquelas portadoras da mutação T790M.

Um ensaio clínico de fase III (NCIC CTG BR.26) [Ellis et al. (2014)], alocou aleatoriamente 720 doentes que tinham sido previamente tratados com quimioterapia ou erlotinib/gefitinib em dois grupos: dacomitinib e placebo. O dacomitinib não melhorou a sobrevivência global comparativamente com o placebo (6,83 meses vs 6,31 meses, respetivamente), contudo os doentes no grupo do dacomitinib tiveram uma SLP superior (2,66 meses vs 1,38 meses) e uma proporção significativamente superior de doentes atingiu uma resposta objetiva (7% vs 1%).

Tento em conta que o dacomitinib não aumenta a sobrevivência global, não deve ser recomendado nos doentes que progridem após quimioterapia e/ou erlotinib e gefitinib [Ellis et al. (2014)].

5.1.3. TKI do EGFR de Terceira Geração

Esta classe de inibidores da tirosina quinase inibe irreversivelmente o EGFR mutado, com particular especificidade para a mutação T790M, com

mínima atividade nos outros membros da família ErbB [Boolell et al. (2015)]. Os dois compostos mais bem estudados são o Rociletinib e o Osimertinib (AZD9291).

5.1.3.1. Rociletinib

O rociletinib (CO-1686; Clovis Oncology) é uma pequena molécula, disponível por via oral, inibidora das formas mutadas mais comuns do EGFR, incluindo as deleções do exão 19, L858R e T790M, mas não das inserções do exão 20. Estudos pré-clínicos confirmaram que o rociletinib tem atividade mínima contra o EGFR *wild-type* [Sequist et al. (2015)].

Num estudo de fase I/II [Sequist et al. (2015)] envolvendo doentes com CNPC com mutação do *EGFR* que tinham progredido após um inibidor do EGFR, taxas de resposta objetiva de 59% e 29% foram encontradas no grupo com e sem mutação T790M, respetivamente. Ao contrário de outros inibidores do EGFR, o tratamento com rociletinib não causou reações adversas na pele. No entanto verificou-se uma alta incidência de hiperglicemia, que foi atribuída à inibição do IGF-1R por um metabolito do fármaco [Minguet et al. (2015)].

Atualmente, a investigação do fármaco está suspensa, uma vez que a FDA, após atualização dos dados dos estudos de fase I/II em curso, conclui não conceder aprovação acelerada do fármaco. Os dados demonstravam taxas de resposta globais de 32% e duração de resposta média de 9 meses, pondo-se em causa se o fármaco seria benéfico em relação à quimioterapia de 2ª linha. Além disso, verificou-se o desenvolvimento de prolongamento do intervalo QT em alguns doentes, levantando a preocupação acerca de arritmias ventriculares como a *Torsade de Pointes*. Com base neste desfecho, os ensaios clínicos TIGER que comparavam a eficácia do rociletinib em comparação com a quimioterapia e/ou erlotinib foram suspensos.

5.1.3.2. Osimertinib

O osimertinib (AZD9291, mereletinib, AstraZeneca) é um potente inibidor irreversível das mutações do EGFR, incluindo a mutação T790M. Dados pré-

clínicos sugerem que o osimertinib é 200 vezes mais potente contra as mutações L858R e T790M do que contra o EGFR *wild-type* [Tan et al. (2015)].

Numa população de doentes com mutação confirmada do EGFR, que progrediram após tratamento prévio com TKI, foi reportada uma taxa de resposta objetiva de 51% [Jänne et al. (2015)]. No grupo de doentes com mutação T790M confirmada, a taxa de resposta foi de 61% e a SLP foi de 9,6 meses, o que se verificou ser bastante superior àquilo que sucedeu nos doentes T790M negativos, com taxa de resposta de 21% e SLP de 2,8 meses [Jänne et al. (2015)]. Os principais efeitos adversos foram reações cutâneas e diarreia, embora de baixo grau [Jänne et al. (2015)].

Atualmente estão em curso os ensaios clínicos AURA que podem definir qual o papel do osimertinib no tratamento dos doentes com mutação adquirida T790M.

5.2. Mutações do ALK

A identificação do gene de fusão *ALK-EML4* no CNPC é hoje tratada em primeira linha com o inibidor da tirosina quinase do ALK, MET e ROS1 crizotinib. A sua aprovação pela EMA como tratamento de primeira linha surgiu em 2012, após os resultados de 2 ensaios clínicos de fase III, PROFILE 1007 e PROFILE 1014. O primeiro constatou a eficácia do crizotinib comparativamente à quimioterapia com pemetrexedo ou docetaxel após um ciclo prévio de platinos, enquanto o segundo constatou o benefício do crizotinib como monoterapia em primeira linha em comparação com cisplatina mais pemetrexedo [Liao et al. (2015)].

Como acontece com outros TKI's, as resistências são o maior problema, com particular importância do desenvolvimento de metástases cerebrais durante o tratamento. As metástases no SNC estão presentes em 20-30% dos doentes ALK positivos no início do tratamento, e embora estas possam responder à terapêutica inicial com crizotinib, até 51% dos doentes que progridem com o crizotinib irão fazê-lo no SNC. Este facto pode representar uma falha farmacocinética devido a fraca penetração do crizotinib no SNC. Terapia local ablativa com radioterapia ou cirurgia pode ser indicada nos doentes com

oligoprogressão no SNC, mantendo a terapia com crizotinib, se a doença extracraniana se mantiver em emissão [Cameron et al. (2015)].

No sentido de se ultrapassar o problema das resistências, vários novos inibidores do ALK estão em investigação, sendo os três mais promissores o ceritinib, o alectinib e o brigatinib.

5.2.1. Inibidores do ALK de Nova Geração

5.2.1.1. Ceritinib

É um inibidor do ALK cerca de 20 vezes mais potente do que o crizotinib, em termos de seletividade para o ALK. Não inibe o MET, mas inibe o ROS1 e o IGF-1R. Em linhagens celulares com resistência adquirida ao crizotinib, o ceritinib demonstrou inibir eficazmente algumas das mutações adquiridas, especialmente a L1196M, G1269A, I1171T e S1206Y. Contudo, não se mostrou efetivo contra as mutações adquiridas G1202R e F1174C [Sullivan et al. (2016)].

O ceritinib foi aprovado pela EMA em 2015, mas está ainda em fase de monitorização.

O ceritinib mostrou-se eficaz em doentes que progrediram com o crizotinib e em doentes crizotinib-*naïve* num estudo de fase I elaborado por Shaw et al. (2014) Neste estudo, que envolveu 130 doentes ALK positivos (47 crizotinib-*naïve* e 83 que tinham feito crizotinib), a taxa de resposta global foi de 58% e o SLP médio foi de 7 meses. Os principais efeitos adversos dose-limitantes incluíram diarreia, náuseas, vômitos, desidratação, elevação das aminotransferases e hipofosfatemia.

Estão a decorrer dois estudos de fase III, um que compara o ceritinib em primeira linha com a quimioterapia padrão (ASCEND-4) e outro que compara o ceritinib com a quimioterapia após resistência ao crizotinib (ASCEND-5).

5.2.1.2. Alectinib

É outro inibidor do ALK projetado para ultrapassar as resistências ao crizotinib. Estudos pré-clínicos em linhagens celulares demonstraram que o fármaco consegue suprimir a proliferação de células com mutações que

conferem resistência ao crizotinib, nomeadamente as mutações L1196M, F1174L e R1275Q [Cameron et al. (2015); Minguet et al. (2015)]. Para além de inibidor do ALK, o alectinib também inibe o RET [Cameron et al. (2015)].

O alectinib foi designado como terapia inovadora pela FDA em 2013 e aprovado no Japão em 2014 para doentes com CNPC ALK positivos. Ainda não está aprovado na Europa.

A eficácia do alectinib foi reportada por dois estudos de fase I/II, um realizado no Japão e outro nos EUA. O estudo Japonês [Seto et al. (2013)] incorporou 46 doentes crizotinib-*naïve*, tendo-se verificado taxas de resposta objetiva de 93,5%, incluindo 2 respostas completas. Numa atualização recente do estudo, a SLP média ainda não tinha sido atingida, mas foi estimada como sendo superior a 29 meses [Ohe et al. (2015)]. O estudo americano [Gadgeel et al. (2014)] contou com 47 doentes que tinham sofrido progressão com o crizotinib, tendo-se verificado taxas de resposta objetiva de 55%, bem como taxas de resposta intracraniana em 52% dos doentes com metástases cerebrais.

Está a decorrer um ensaio clínico de fase III (ALEX) que visa comparar o alectinib com o crizotinib como tratamento de primeira linha nos doentes ALK positivos com CNPC [Cameron et al. (2015)].

5.2.1.3. Brigatinib

O brigatinib (ou AP26113) é um inibidor mais potente do ALK do que o crizotinib, conferindo também atividade para mutações que conferem resistência ao crizotinib. Além disso, é ativo contra o ROS1 e em concentrações superiores pode inibir mutações do EGFR, incluindo a T790M [Cameron et al. (2015)].

Recebeu a designação de terapêutica inovadora pela FDA em 2014 para os doentes com CNPC ALK positivos que sofreram progressão com o crizotinib.

Está a decorrer um estudo de fase I/II elaborado por Camidge et al (2015) cujos resultados preliminares demonstraram que entre 72 doentes avaliados com CNPC e ALK positivos, 72% responderam ao brigatinib e desses, 100% dos crizotinib-*naïve* e 69% dos previamente tratados com crizotinib responderam. O SLP médio foi de 14 meses (11,75 meses nos que fizeram crizotinib). Além disso, 50% dos doentes com lesões metastáticas cerebrais detetáveis no início do

tratamento obtiveram resposta, com uma SLP média intracraniana de 24,25 meses.

Estes dados suportam a hipótese de que o brigatinib tem atividade anti-tumoral promissora nos doentes ALK positivos independentemente de terem recebido ou não tratamento prévio com crizotinib, incluindo nos doentes com metástases cerebrais [Camidge et al (2015)].

6. Conclusão

A investigação no que diz respeito ao tratamento do cancro do pulmão em estadio IV sofreu um avanço na última década com a identificação de mutações suscetíveis de terapêutica dirigida. Estes tratamentos vieram oferecer uma alternativa terapêutica para quem a quimioterapia não foi eficaz. Os inibidores de tirosina quinase apesar das respostas iniciais muito promissoras têm uma desvantagem, que consiste no aparecimento de resistências, em média, ao fim de um ano de tratamento. Esta particularidade está inerente à heterogeneidade das células tumorais que possuem a capacidade de se adaptarem às alterações no seu microambiente, criando estratégias que lhes permitem escapar aos mecanismos de apoptose induzidos por estes fármacos, através de mutações nos locais de ligação do fármaco no seu alvo celular.

Hoje em dia, muito se sabe acerca da biologia da célula tumoral, podendo concluir-se que os inibidores de tirosina quinase terão um efeito transitório, uma vez que as resistências irão surgir no decurso do tratamento, o que nos leva a postular que o principal objetivo não seria impedir que as mutações ocorressem, mas encontrar fármacos que as possam ir ultrapassando de modo a que a doença possa ser controlada o maior tempo possível.

No futuro, os novos inibidores do EGFR e do ALK que estão em desenvolvimento, podem surgir como uma alternativa terapêutica à QT nos doentes com CNPC em estadio IV, permitindo eventualmente a sua sequenciação com impacto significativo na sobrevivência destes doentes.

A salientar também que o ALK e o EGFR são encontrados numa pequena percentagem dos doentes com cancro do pulmão. Assim, esforços devem ser efetuados no sentido de se encontrarem alternativas para a restante população,

nomeadamente para doentes com a mutação KRAS, que apresenta uma maior prevalência, com mais de 30% dos casos.

Bibliografia

- 1- Vansteenkiste J; De Ruyscher D; Eberhardt W E E; Lim E; Senan S, Felip E; Peters E (2013): *Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Annals of Oncology. 24 (Supplement 6): vi89–vi98.
- 2- Besse B; Adjei A; Baas P; Meldgaard P; Nicolson M; Paz-Ares L; et al (2014): *2nd ESMO Consensus Conference on Lung Cancer: non-small-cell lung cancer first-line/second and further lines of treatment in advanced disease*. Annals of Oncology. 25: 1475–1484.
- 3- Reck M; Popat S; Reinmuth N; De Ruyscher D; Kerr K M; Peters S (2014): *Metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Annals of Oncology. 00: 1–13.
- 4- Ettinger D S; Wood D E; Akerley W; Bazhenova L; Borghaei H; Camidge D R; et al (2015): *NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Non-Small Cell Lung Cancer. Version 7*. National Comprehensive Cancer Network. 2015; Disponível em www.nccn.org/patients.
- 5- Maione P; Sacco P C; Sgambato A; Casaluce F; Rossi A; Gridelli C (2015): *Overcoming resistance to targeted therapies in NSCLC: current approaches and clinical application*. Ther Adv Med Oncol. Vol. 7(5) 263–273.
- 6- Suda K; Murakami I; Saka K; Tomizawa K; Mizuuchi H; Sato K; et al (2016): *Heterogeneity in resistance mechanisms causes shorter duration of epidermal growth factor receptor kinase inhibitor treatment in lung cancer*. Lung Cancer. 91 36–40.
- 7- Sun J M; Ahn M J; Cho Y L; Ahn J S; Park K (2013): *Clinical implications of T790M mutation in patients with acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors*. Lung Cancer. 82 294– 298.
- 8- Kuiper J L; Heideman D A M; Thunnissen E; Paul M A; van Wijck A W; Postmus P E; et al (2014): *Incidence of T790M mutation in (sequential) rebiopsies in EGFR-mutated NSCLC-patients*. Lung Cancer. 85 19–24.
- 9- Remon J; Morán T; Majem M; Reguart N; Dalmau E; Márquez-Medina D; et al (2014): *Acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in EGFR-mutant non-small cell lung cancer: A new era begins*. Cancer Treatment Reviews. 40 93–101.
- 10- van der Wekken A J; Sabar A; Hiltermann T J N; Kok K; van den Berg A; Groen H J M (2016): *Resistance mechanisms after tyrosine kinase inhibitors afatinib and crizotinib in non-small cell lung cancer, a review of the literature*. Critical Reviews in Oncology/Hematology.

- 11- Song H N; Jung K S; Yoo K H; Cho J; Lee J Y; Lim S H; et al (2015): *Acquired C797S Mutation upon Treatment with a T790M-Specific Third-Generation EGFR Inhibitor (HM61713) in Non-Small Cell Lung Cancer*. International Association for the Study of Lung Cancer. Case Report.
- 12- Liao B C; Lin C C; Shih J Y; Yang J C H (2015): *Treating patients with ALK-positive non-small cell lung cancer: latest evidence and management strategy*. Ther Adv Med Oncol. Vol. 7(5) 274–290.
- 13- Sullivan I; Planchard D (2016): *ALK inhibitors in non-small cell lung cancer: the latest evidence and developments*. Ther Adv Med Oncol. Vol. 8(1) 32–47.
- 14- Farina F; Gambacorti-Passerini C (2016): *ALK inhibitors for clinical use in cancer therapy*. Frontiers in Bioscience. Elite, 8, 46-60.
- 15- Liang W; He Q; Chen Y; Chuai S; Yin W; Wang W; et al (2016): *Metastatic EML4-ALK fusion detected by circulating DNA genotyping in an EGFR mutated NSCLC patient and successful management by adding ALK inhibitors: a case report*. BMC Cancer. 16:62.
- 16- Wang S; Su X; Bai H; Zhao J; Duan J; An T; et al (2015): *Identification of plasma microRNA profiles for primary resistance to EGFR-TKIs in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients with EHRF activating mutation*. Journal of Hematology & Oncology. 8:127.
- 17- Bayliss R; Choi J; Fennell D A; Fry A M; Richards M W (2015): *Molecular mechanisms that underpin EML4-ALK driven cancers and their response to targeted drugs*. Cell. Mol. Life Sci.
- 18- Cameron L; Solomon B (2015): *New Treatment Options for ALK-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer*. Curr. Treat. Options in Oncol. 16: 49.
- 19- Ricciuti B; Mecca C; Cenci M; Leonardi G C; Perrone L; Mencaroni C; et al (2015): *miRNAs and resistance to EGFR—TKIs in EGFR-mutant non-small cell lung cancer: beyond ‘traditional mechanisms’ of resistance*. Ecancer. 9:569.
- 20- Boolell V; Alamgeer M; Watkins D N; Ganju V (2015): *The Evolution of Therapies in Non-Small Cell Lung Cancer*. Cancers. 7, 1815-1846.
- 21- Ge L; Shi R (2015): *Progress of EGFR-TKI and ALK/ROS1 inhibitors in advanced non-small cell lung cancer*. Int J Clin Exp Med. 8(7):10330-10339.
- 22- Shi H; Zhang X; Wang F; Liu D (2015): *Curative effect analysis of different treatments for gefitinib-resistance advanced non-small cell lung cancer patients*. Int J Clin Exp Med. 8(9):16064-16070.

- 23- Song Z; Wang M; Zhang A (2015): *Alectinib: a novel second generation anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitor for overcoming clinically-acquired resistance*. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 5(1):34–37.
- 24- Huang L; Fu L (2015): *Mechanisms of resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors*. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 5(5):390–401.
- 25- Minguet J; Smith K H; Bramlage P (2015): *Targeted therapies for treatment of non-small cell lung cancer - recent advances and future perspectives*. *Int. J. Cancer*. 00, 00–00.
- 26- Wang C; Wang W; Wang C; Tang Y; Tian H (2015): *Combined therapy with EGFR TKI and gambogic acid for overcoming resistance in EGFR-T790M mutant lung cancer*. *Oncology Letters*. 10: 2063-2066.
- 27- Li S; Chen S; Jiang Y; Liu J; Yang X; Quan S (2015): *Synergistic interaction between MEK inhibitor and gefitinib in EGFR-TKI-resistant human lung cancer cells*. *Oncology Letters*. 10: 2652-2656.
- 28- Roviello G (2015): *The distinctive nature of adenocarcinoma of the lung*. *Onco Targets and Therapy*. 8 2399–2406.
- 29- Yoshida T; Song L; Bai Y; Kinose F; Li J; Ohaegbulam K C; et al (2016): *ZEB1 Mediates Acquired Resistance to the Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer*. *PLoS ONE*. 11(1): e0147344.
- 30- Qiao X; Zhang Y; Wang J; Nong J; Li X; Yang X; et al (2015): *Subsequent treatment of epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor failure in patients with advanced lung adenocarcinoma*. *Thoracic Cancer*. 6 678–686.
- 31- Kim W J; Kim S; Choi H; Chang J; Shin H J; Park C K; et al (2015): *Histological transformation from non-small cell to small cell lung carcinoma after treatment with epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor*. *Thoracic Cancer*. 6 800–804.
- 32- Shea M; Costa D B; Rangachari D (2015): *Management of advanced non-small cell lung cancers with known mutations or rearrangements: latest evidence and treatment approaches*. *Ther Adv Respir Dis*. 1–17.
- 33- Bordi P; Del Re M; Danesi R; Tiseo M (2015): *Circulating DNA in diagnosis and monitoring EGFR gene mutations in advanced non-small cell lung cancer*. *Transl Lung Cancer Res*. 4(5):584-597.
- 34- Klempner S J; Raufi A; Ou S H I (2015): *Moving molecularly directed therapies to the first-line in ALK-positive lung cancer: crizotinib is just the beginning*. *Transl Lung Cancer Res*. 4(5):649-652.

- 35- Costa D B; Kobayashi S S (2015): *Whacking a mole-cule: clinical activity and mechanisms of resistance to third generation EGFR inhibitors in EGFR mutated lung cancers with EGFR-T790M*. Transl Lung Cancer Res. 4(6):809-815.
- 36- Mologni L (2015): *Current and future treatment of anaplastic lymphoma kinase-rearranged cancer*. World J Clin Oncol. 6(5): 104-108.
- 37- Tan C S; Gilligan D; Pacey S (2015): *Treatment approaches for EGFR-inhibitor-resistant patients with non-small-cell lung cancer*. Lancet Oncol. 16: e447–59.
- 38- Goldberg SB; Oxnard G R; Digumarthy S; Muzikansky A; Jackman D M; Lennes I T; et al (2013): *Chemotherapy With Erlotinib or Chemotherapy Alone in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer With Acquired Resistance to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors*. TheOncologist. 18 :1214–1220.
- 39- Minamia S; Kijimab T; Hamaguchia M; Nakatania T; Kobaa T; Takahashi R; et al (2013): *Phase II study of pemetrexed plus intermittent erlotinib combination therapy for pretreated advanced non-squamous non-small cell lung cancer with documentation of epidermal growth factor receptor mutation status*. Lung Cancer. 82 271– 275.
- 40- Park K; Ahn M; Yu C; Kim S; Lin M; Sriuranpong V; et al: *ASPIRATION (2014): First -line erlotinib until and beyond RECIST progression in Asian patients with EGFR mutation-positive NSCLC*. Annals of Oncology. 25 (Supplement 4): iv426–iv470.
- 41- Soria J C; Wu Y L; Nakagawa K; Kim S W; Yang J J; Ahn M J; et al (2015): *Gefitinib plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy in EGFR-mutation-positive non-small-cell lung cancer after progression on first-line gefitinib (IMPRESS): a phase 3 randomised trial*. Lancet Oncol. 16: 990–98.
- 42- Katakami N; Atagi S; Goto K; Hida T; Horai T; Inoue A; et al (2013): *LUX-Lung 4: A Phase II Trial of Afatinib in Patients With Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer Who Progressed During Prior Treatment With Erlotinib, Gefitinib, or Both*. J Clin Oncol. 31:3335-3341.
- 43- Miller V A; Hirsh V; Cadranel J; Chen Y M; Park K; Kim S W; et al (2012): *Afatinib versus placebo for patients with advanced, metastatic non-small-cell lung cancer after failure of erlotinib, gefitinib, or both, and one or two lines of chemotherapy (LUX-Lung 1): a phase 2b/3 randomised trial*. Lancet Oncol. 13: 528–38.
- 44- Janjigian Y Y; Smit E F; Groen H J M; Horn L; Gettinger S; Camidge R; et al (2014): *Dual Inhibition of EGFR with Afatinib and Cetuximab in Kinase Inhibitor-Resistant EGFR-Mutant Lung Cancer With and Without T790M Mutations*. Cancer Discov. 4(9): 1036–1045.

- 45- Park K; Cho B C; Kim D W; Ahn M J; Lee S Y; Gernhardt; et al (2014): *Safety and Efficacy of Dacomitinib in Korean Patients with KRAS Wild-Type Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer Refractory to Chemotherapy and Erlotinib or Gefitinib. A Phase I/II Trial.* J Thorac Oncol. 9: 1523–1531.
- 46- Reckamp K L; Giaccone G; Camidge D R; Gadgeel S M; Khuri F R; Engelman J A; et al (2014): *A Phase 2 Trial of Dacomitinib (PF-00299804), an Oral, Irreversible Pan-HER (Human Epidermal Growth Factor Receptor) Inhibitor, in Patients With Advanced Non–Small Cell Lung Cancer After Failure of Prior Chemotherapy and Erlotinib.* Cancer.
- 47- Ellis P M; Shepherd F A; Millward M; Perrone F; Seymour L; Liu G; et al (2014): *Dacomitinib compared with placebo in pretreated patients with advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (NCIC CTG BR.26): a double-blind, randomised, phase 3 trial.* Lancet Oncol. 15: 1379–88.
- 48- Yoshimuraa N; Kudoha S; Kimuraa T; Mitsuokaa S; Matsuuraa K; Hirataa K; et al (2006): *EKB-569, a new irreversible epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, with clinical activity in patients with non-small cell lung cancer with acquired resistance to gefitinib.* Lung Cancer. 51, 363—368.
- 49- Jänne P A; von Pawel J; Cohen R B; Crino L; Butts C A; Olson S S; et al (2007): *Multicenter, Randomized, Phase II Trial of CI-1033, an Irreversible Pan-ERBB Inhibitor, for Previously Treated Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer.* J Clin Oncol. 25:3936-3944.
- 50- Sequist L V; Besse B; Lynch T J; Miller V A; Wong K K; Gitlitz B; et al (2010): *Neratinib, an Irreversible Pan-ErbB Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor: Results of a Phase II Trial in Patients With Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer.* J Clin Oncol. 28:3076-3083.
- 51- Cross D A E; Ashton S E; Ghiorghiu S; Eberlein C; Nebhan C A; Spitzler P J; et al (2014): *AZD9291, an irreversible EGFR TKI, overcomes T790M-mediated resistance to EGFR inhibitors in lung cancer.* Cancer Discov. 4(9): 1046–1061.
- 52- Walter A O; Sjin R T T; Haringsma H J; Ohashi K; Sun J; Lee K; et al (2013): *Discovery of a mutant-selective covalent inhibitor of EGFR that overcomes T790M-mediated resistance in NSCLC.* Cancer Discov. 3(12): 1404–1415.
- 53- Soria J; Sequist L V; Goldman J W; Wakelee H A; Gadgeel S M; Varga A; et al (2014): *Interim phase 2 results of study CO-1686-008: A phase 1/2 study of the irreversible, mutant selective, EGFR inhibitor rociletinib(CO-1686) in patients with non-small cell lung cancer.* Late Breaking Abstracts. 199.
- 54- Sequist L V; Soria J C; Goldman J W; Wakelee H A; Gadgeel S M; Varga A; et al (2015): *Rociletinib in EGFR-Mutated Non–Small-Cell Lung Cancer.* N Engl J Med. 372;18.

- 55- Jänne P A; Yang J C H; Kim D W; Planchard D; Ohe Y; Ramalingam S S; et al (2015): *AZD9291 in EGFR Inhibitor–Resistant Non–Small-Cell Lung Cancer*. N Engl J Med. 372:1689-99.
- 56- Shaw A T; Kim D W; Mehra R; Tan D S W; Felip E; Chow L Q M; et al (2014): *Ceritinib in ALK-Rearranged Non–Small-Cell Lung Cancer*. N Engl J Med. 370:1189-97.
- 57- Seto T, Kiura K, Nishio M, Nakagawa K, Maemondo M, Inoue A, et al (2013): *CH5424802 DRO5424802 for patients with ALK-rearranged advanced non-small-cell lung cancer DAF-001JP study: a single-arm, open-label, phase 1–2 study*. Lancet Oncol. 14D7]:590–8.
- 58- Ohe Y, Nishio M, Kiura K, Seto T, Nakagawa K, Maemondo M, et al (2015): *A phase I/II study with a CNSpenetrant, selective ALK inhibitor alectinib in ALKrearranged non-small cell lung cancer (ALK+ NSCLC) patients (pts): updates on progression free survival (PFS) and safety results from AF-001JP*. J Clin Oncol. 33(15_suppl):8061.
- 59- Gadgeel SM, Gandhi L, Riely GJ, Chiappori AA, West HL, Azada MC, et al (2014): *Safety and activity of alectinib against systemic disease and brain metastases in patients with crizotinib-resistant ALK-rearranged nonsmall-cell lung cancer DAF-002JG: results from the dose-finding portion of a phase 1/2 study*. Lancet Oncol. 5D10]:1119–28.
- 60- Camidge DR, Bazhenova L, Salgia R, Langer CJ, Gold KA, Rosell R, et al (2015): *Safety and efficacy of brigatinib DAP26113] in advanced malignancies, including ALK+ non-small cell lung cancer DNSCLC]*. J Clin Oncol. 33D15_suppl]:8062.
- 61- Siegelin MD, Borczuk AC (2014): *Epidermal growth factor receptor mutations in lung adenocarcinoma*. Laboratory Investigation. 94, 129–137.